

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Т.В.Трухачева¹, Д.В.Моисеев,
Л.М.Залашко¹, А.И.Жебентяев, П.Т.Петров¹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИКЛОЦИТИДИНМОНОФОСФАТА И ДРУГИХ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИТИ- ДИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТ- ВАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Витебский государственный
медицинский университет

¹ Научно-фармацевтический центр РУП
«Белмедпрепараты»

Разработана простая и экспрессная методика ВЭЖХ определения цЦМФ в ЛС. Определение цЦМФ проводится на обращенно-фазовой колонке (Zorbax SB C-8, 250x4,6 мм, 5 мкм) с изократическим режимом элюирования 0,01 М дигидрофосфатом калия (pH=3,0). Градуировочный график для цЦМФ линеен в пределах 20-400 мкг/мл (RSD% <1%); для примесей 2-40 мкг/мл (RSD% <5%).

Циклоцитидинмонофосфат (цЦМФ) является синтетическим аналогом пиримидинового нуклеозида, обладает активностью в отношении вирусов герпеса человека, включая вирус Herpes Simplex типов 1 и 2, вирус Varicella Zoster. Лекарственное средство эффективно в случае резистентности возбудителя к ацикловиру [1, 2].

Разработка методики анализа, позволяющей надежно определять концентрации действующего вещества и примесей в субстанции и лекарственных средствах является актуальной задачей.

Целью настоящего исследования являлась разработка методики определения группы веществ, производных пиримидина (цитозин, цитидин, ЦМФ, О²,2'-циклоцитидин, О²,2'-циклоцитидинмонофосфат) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, позволяющей разделить данные вещества в условиях изократического элюирования без применения ион-парных реагентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные пиримидина, приобретенные по каталогам фирм: цитозин – № С-3506 «Sigma», цитидинмонофосфат – № С-1133 «Sigma», цитидин – № 102318.005 «Merck»; а также циклоцитидин и циклоцитидинмонофосфат, синтезированные в лаборатории технологии биологически активных веществ научно-фармацевтического центра РУП «Белмедпрепараты». Количественное содержание веществ в используемых стандартах определяли методом нормирования (Таблица 1).

Таблица 1

Хроматографические параметры разделяемых веществ

		Время удерживания (t _R), мин	Содержание вещества в стандарте, %	Эффективность разделения (N)	Коэффициент асимметрии пика (A _s)	Селективность (α)	Разрешение (R _s)
1.	цЦМФ	3,07	99,41	~ 12000	0,90		
2.	Цитозин	3,32	99,91	~ 15000	0,86	2,13 (1 и 2)	2,23 (1 и 2)
3.	Циклоцитидин	3,61	100,00	~ 13000	0,87	2,52 (2 и 3)	2,56 (2 и 3)
4.	ЦМФ	3,82	99,81	~ 12000	0,89	1,61 (3 и 4)	1,55 (3 и 4)
5.	Цитидин	6,04	99,44	~ 14000	0,93	10,79 (4 и 5)	10,23 (4 и 5)

Работа выполнялась на жидкостном хроматографе фирмы Agilent HP 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A. Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводилась с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D.

Разделение проводилось на хроматографической колонке Zorbax StableBond C-8 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза: 0,01 М раствор дигидрофосфата калия pH=3,0, скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин, объем пробы 10 мкл. Рабочая длина волны 262 нм выбрана на основании анализа спектров поглощения в области максимумов пиков определяемых веществ с помощью фотодиодного детектора Diode-array detector Agilent HP 1100 G1315B и программы Agilent ChemStation for LC 3D. Разделение проводилось при температуре колонки 20°C, давление в системе около 100 bar.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор оптимальных условий элюирования данных веществ осуществлялся на основании проведенных ранее исследований по закономерностям их сорбции при различных pH ПФ в условиях ОФ хроматографирования [3]. Для разделения использовались хроматографические колонки с различными сорбентами (с привитыми алкильными группами C-18, C-8, а также с CN-группой). Наилучшее разделение веществ было достигнуто при применении колонки, заполненной силикагелем с привитыми алкильными группами C-8.

При разработке методики использовались рекомендации, приведенные в литературе [4-7]. Рассчитанные значения относительных стандартных отклонений (RSD%) для пика основного вещества – цЦМФ не превышают 1% (20-400 мкг/мл), для примесей – циклоцитидина, цитидина, ЦМФ, цитозина не превышают 5% (2-40 мкг/мл), т.е. находятся в пределах, рекомендованных для количественного анализа ЛС. Значения коэффициентов селективности (α) и разрешения (R_s) для двух соседних пиков указывают на хорошее разделение пиков соответствующих веществ (Таблица 1).

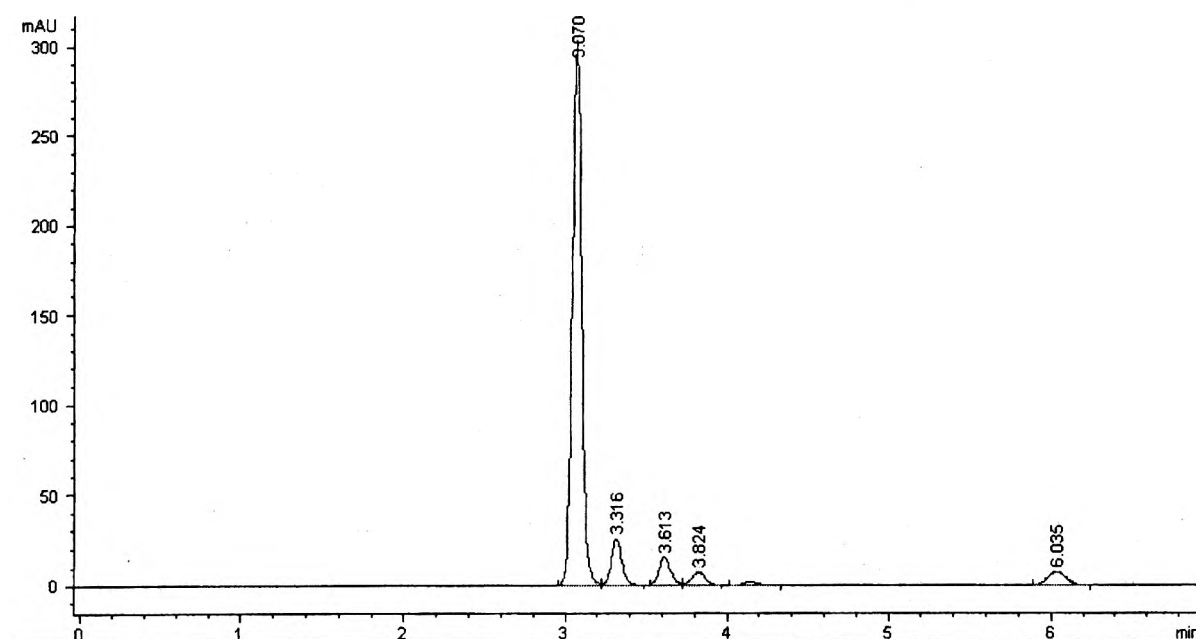


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси цЦМФ (основной пик) и возможных примесей.

Оценка устойчивости аналитической системы к небольшим изменениям условий хроматографирования (концентрация и pH раствора подвижной фазы, температуры).

В таблице 2 приведены данные по удерживанию веществ при изменении одного из параметров хроматографирования в сравнении со стандартными условиями (0,01 М дигидрофосфат калия pH=3,0, температура колонки 20°C).

Таблица 2

Времена удерживания веществ при изменении условий хроматографирования (t_R ; мин)

Вещества	Стандартные условия	Температура		Значение pH ПФ		Концентрация ПФ	
		15°C	25°C	2,5	3,5	0,005M	0,02M
цЦМФ	3,07	3,12	3,01	3,05	3,05	3,05	3,05
Цитозин	3,32	3,41	3,21	3,23	3,35	3,21	3,33
Циклоцитидин	3,61	3,71	3,50	3,54	3,59	3,47	3,65
ЦМФ	3,82	3,98	3,64	3,82	3,74	3,77	3,77
Цитидин	6,04	6,51	5,55	5,76	6,15	5,71	6,07

Как видно из таблицы 2, порядок выхода веществ из колонки не изменяется при незначительном изменении условий хроматографирования. При увеличении температуры колонки время удерживания всех веществ уменьшается. Увеличение концентрации и значения pH раствора ПФ приводит к увеличению времени удерживания цитозина, циклоцитидина и цитидина, время удерживания цЦМФ и ЦМФ практически не изменяется. Площади пиков исследуемых веществ при изменении условий хроматографирования оставались постоянными.

Пробоподготовка

1. Определение цЦМФ в мазевых формах

Точную навеску мази, содержащую в пересчете около 0,04 г цЦМФ (0,8 г – 5% мази), помещают в колбу вместимостью 200,0 мл, прибавляют 150,0 мл очищенной воды и выдерживают на водяной бане при температуре $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 15 минут, периодически встряхивая. Содержимое колбы переносят в мерную колбу вместимостью 200,0 мл, доводят объем раствора водой очищенной, предварительно нагретой до 50°C , тщательно перемешивают, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки водой очищенной. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с диамет-

ром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

2. Приготовление рабочего стандартного образца (РСО) цЦМФ

Точную навеску цЦМФ (0,0400г) переносят в мерную колбу вместимостью 200,0 мл, доводят объем раствора водой очищенной. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Приготовленные растворы исследуемого вещества и РСО попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе, получая не менее 5 хроматограмм для каждого раствора.

Обработка результатов измерений

1. Расчет количественного содержания цЦМФ

Количественное содержание (массовую долю) цЦМФ в мазях находят по формуле:

$$\omega_{\text{мазь}} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100\%}{S_0 \cdot m_1} \quad (1)$$

где: S_1 – среднее значение площадей пиков цЦМФ, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 – среднее значение площадей пиков цЦМФ, вычисленное из хроматограмм стандартного раствора;

m_1 – масса навески лекарственного средства в граммах;
 m_0 – масса навески РСО цЦМФ.

2. Содержание прочих примесей рассчитывается по формуле:

$$\omega_{\text{прим}} = \frac{S_{\text{прим}} \cdot 100\%}{S_{\text{общ}}} \quad (2)$$

где: $S_{\text{прим}}$ – среднее значение суммы площадей всех пиков примесей на хроматограмме, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

$S_{\text{общ}}$ – среднее значение суммы площадей всех пиков на хроматограмме, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора.

ВЫВОДЫ

Разработана методика ВЭЖХ определения цЦМФ и примесей, позволяющая надежно разделить действующее вещество и примеси в течение 7 минут. Методика может быть использована в контроле качества субстанций и лекарственных средств на основе цЦМФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трухачева Т.В., Кевра М.К., Новикова И.В. и др. Противовирусная активность циклоцитидинмонофосфата in vitro// Тезисы докладов X Российского национального конгресса «Человек и лекарство» - Москва, 2003.

2. Трухачева Т.В., Залашко Л.М., Панкратов В.Г. и др. Эффективность мази нуклеавир в лечении заболеваний, вызванных вирусом герпеса// Тезисы докладов XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство» - Москва, 2004.

3. Моисеев Д.В., Марченко С.И., Моисеева А.М. Влияние природы растворителя и значения pH на подвижность производных пиримидина и пурина в ТСХ// Материалы 57-й итоговой научной конференции студентов и молодых ученых ВГМУ. – Витебск, 2005. - С. 194-195.

4. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидации) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе// Химико-фармацев-

тический журнал. – 2004. – Т. 38, №4. – С. 40-56.

5. Эпштейн Н.А. Оценка максимально допустимых значений относительного стандартного отклонения площадей (высот) пиков при количественном анализе субстанций методом ВЭЖХ// Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – т. 37, №11. – С. 45-46.

6. British Pharmacopeia, London (2001).

7. The United States Pharmacopeia, (The USP 24th Ed.), Easton, Rand Mc Nally: Tounton, MA, 2000.

SUMMARY

T.V.Trukhacheva, D.V.Moiseev, L.M.Zalashko, A.I.Zhebentayev, P.T.Petrov HPLC DETERMINATION OF CCMP AND OTHER DERIVATIVES OF CYTIDINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS
 Fast and simple procedure for the determination of the cCMP in pharmaceutical preparations by HPLC is described. A reversed-phase column (Zorbax SB C-8, 250x4,6 mm, 5 mcm) with isocratic elution by 0,01 M potassium phosphate buffer (pH=3,0) is used to separate cCMP. The calibration graph for cCMP was linear from 20-400 mcg/ml (RSD <1%); graph for impurities was linear from 2-40 mcg/ml (RSD <5%).

Д.В.Моисеев, А.И.Жебентяев,
 П.Т.Петров¹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПУРИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ В ЧАЕ, КОФЕ И КАКАО МЕТОДОМ ВЭЖХ

Витебский государственный
 медицинский университет

¹ Научно-фармацевтический центр РУП
 «Белмедпрепараты»

Разработана простая и экспрессная методика определения теобромина, теофиллина и кофеина в чае, кофе и какао методом ВЭЖХ. Определение алкалоидов проводится на обращенно-фазовой